基础研究

氯高铁血红素对妊娠期高血压大鼠的治疗及机制

龙买连，夏爱斌，程春霞，李瑞珍
中南大学湘雅三医院妇产科，湖南 长沙 410013

摘要：目的 初步探讨血红素氧合酶诱导剂氯高铁血红素(Hemin)对妊娠期高血压(HDCP)大鼠的治疗作用及可能调控机制。**方法** 将18只受孕SD大鼠于妊娠第12天随机分为3组(6只/组)：HDCP模型组、Hemin干预组、正常妊娠组。HDCP模型组和Hemin干预组于妊娠第14天起连续7 d予亚硝基左旋精氨酸甲酯(80 mg/kg)灌胃建立HDCP模型，正常妊娠组予等量生理盐水灌胃处理，Hemin干预组于妊娠第16天起每日下午腹腔注射Hemin(30 mg/kg)。用分光光度法测定各组胎盘组织血红素氧合酶(HO)的活性和碳氧血红蛋白(COHb)水平，ELSIA测定各组胎盘组织匀浆上清液可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFIt-1)、血管内皮生长因子(VEGF)水平。**结果** 妊娠第20天，HDCP模型组孕鼠血压和24 h尿蛋白明显高于正常妊娠组和Hemin干预组($P<0.05$)，而HO活性和COHb含量明显低于正常妊娠组和Hemin干预组($P<0.05$)，Hemin干预组血压及24 h尿蛋白高于正常组($P<0.05$)，而HO活性和COHb含量较正常组低($P<0.05$)；HDCP模型组孕鼠胎盘组织sFIt-1水平明显高于正常妊娠组和Hemin干预组($P<0.05$)，而胎盘组织中VEGF水平明显低于正常妊娠组和Hemin干预组($P<0.05$)，Hemin干预组孕鼠胎盘组织sFIt-1水平高于正常组水平($P<0.05$)，而VEGF水平低于正常组水平($P<0.05$)。**结论** Hemin能够降低妊娠期高血压孕鼠的血压及尿蛋白，其可能机制是通过上调胎盘组织中HO的活性，增加代谢产物CO，降低胎盘组织中sFIt-1，并升高VEGF水平来发挥调控作用的。

关键词：氯高铁血红素；血红素氧合酶；妊娠期高血压；可溶性血管内皮生长因子受体-1；血管内皮生长因子

Therapeutic effect of hemin on gestational hypertension in rats and the mechanism

LONG Mailian, XIA Aibin, CHENG Chunxia, LI Ruizhen
Department of Gynecology and Obstetrics, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effects of hemin, an inducer of heme oxygenase, in a rat model of gestational hypertension and explore the possible mechanism. **Methods** Eighteen pregnant SD rats at day 12 of gestation were randomized equally into gestational hypertension model group, hemin treatment group, and normal pregnancy (control) group. In the former two groups, the rats were subjected to daily nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 80 mg/kg) gavage since gestational day 14 for 7 consecutive days to induce gestational hypertension; saline was administered in the same manner in the control rats. The rats in hemin group received daily intraperitoneal injection of hemin (30 mg/kg) starting from gestational day 16. HO activity and carboxyhemoglobin (COHb) level in rat placental tissue were detected with spectrophotometric method, and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFIt-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) level in the placental tissue homogenate supernatant were detected using ELSIA. **Results** At gestational day 20, the blood pressure and 24-h urinary protein were significantly higher in the model group than in the other two groups ($P<0.05$), and were higher in hemin group than in the control group ($P<0.05$); HO activity and COHb content in the placenta tissue were the lowest in the model group ($P<0.05$), and was lower in hemin group than in the control group ($P<0.05$). The level of sFIt-1 was significantly higher and VEGF level significantly lower in the model group than in the other two groups ($P<0.05$); sFIt-1 level remained higher and VEGF lower in hemin group than in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Hemin can reduce blood pressure and urinary protein in rats with gestational hypertension possibly by up-regulating HO activity, enhancing carbon monoxide production, reducing sFIt-1 and increasing VEGF in the placental tissue.

Key words: hemin; heme oxygenase; gestational hypertension; soluble vascular endothelial growth factor receptor-1; vascular endothelial growth factor

妊娠期高血压疾病(HDCP)是妊娠期常见的多器官功能紊乱综合症，主要表现为高血压和蛋白尿[1]，但其具体发病机制不清，目前尚无有效预防及治愈该疾病的方法。血红素氧合酶(HO)是近年来发现的一种重要的抗氧化酶，它可催化亚铁血红素分解生成一氧化碳(CO)、胆绿素和游离铁离子[2]。HO及其代谢产物在HDCP中发挥着舒张血管、保护内皮功能、降低胎盘氧化应激等保护性作用[3]。理论上，能上调HO表达和活性的药物可能成为治疗HDCP的有效方法。目前国内暂未见在HDCP动物模型体内的HO调控作用的研

收稿日期：2014-12-15
基金项目：湖南省自然科学基金(2015JJ4050)
作者简介：龙买连，硕士，E-mail: 347390990@qq.com
通信作者：夏爱斌，E-mail: 245180977@qq.com

究。本研究通过建立HDCP大鼠模型，并使用HO诱导剂氯高铁血红素(Hemin)干预，检测干预后的各项指标的变化，探讨Hemin对HDCP大鼠的治疗作用及可能调控机制，旨在为临床治疗该疾病提供理论资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 *实验动物* Spragne-Dawley雌性大鼠，2~3月龄，体质量200~250 g，无特定病原体环境饲养，由湘雅三医院实验动物房提供。大鼠自由饮水和摄食，光照时间为6am~6pm，恒温25~26 ℃，相对湿度70%左右，定期紫外线消毒，通风良好，饲养1周适应环境后开始实验处理。

1.1.2 *主要试剂* 亚硝基左旋精氨酸甲酯(L.NAME)、Hemin、NADPH均购自美国Sigma公司，ELISA试剂盒购自武汉华美，BCA蛋白定量试剂盒购自康为世纪试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 *动物分组及HDCP模型建立* 取正常成年SD雌性大鼠24只，按雌雄2∶1合笼，每日清晨取雌鼠阴道分泌物进行涂片，显微镜下观察发现精子计为妊娠第0天，获得受孕大鼠18只。妊娠第12天将18只孕鼠随机分为3组(6只/组)：HDCP模型组、Hemin干预组、正常妊娠组(作为对照)。HDCP模型组、Hemin干预组于妊娠第14天起连续7 d予亚硝基左旋精氨酸甲酯(L.NAME，80 mg/kg)[4-5]灌胃建立HDCP模型，正常妊娠组予等量生理盐水灌胃。其中Hemin干预组于妊娠第16天起每日下午予Hemin(30 mg/kg)[6]腹腔注射。3组孕鼠于妊娠第12、16、20天用大鼠无创尾动脉血压监测仪测尾动脉血压(即尾容积法测量大鼠血压：测量过程在避光环境中进行，将孕鼠置于预热的固定器内，连接好测量仪器，待其安静且血压测量仪上出现稳定的脉搏波形时开始测量，每测量一次后待脉搏波形恢复平稳后行下一次测量，每只大鼠测量5次，取平均值)、标准代谢笼收集24 h尿蛋白[7]。妊娠第20天利多卡因麻醉下处死孕鼠，取两子宫角处典型胎盘，生理盐水漂洗后，投入−80 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 *胎盘组织中HO活性的测定* 根据HO降解血红素生成胆红素和CO的原理，以样品反应物中胆红素的生成量代表HO的活性[8]。胎盘组织以冷的0.1 mol/L的磷酸钾缓冲液(KH_2PO_4，pH 7.4)漂洗后，加4倍体积同种缓冲液。用匀浆器在冰浴上匀浆，4 ℃以15 000 r/min离心15 min，取上清液，分成两份，一份用于蛋白测定，一份用于测定HO活性。反应体系为胎盘组织匀浆上清液20 μl，2 mmol/L正铁血红素40 μl，还原型辅酶II(NADPH)40 μl，健康SD大鼠肝组织匀浆上清液(作为胆绿素还原酶的来源)20 μl，0.1 mol/L KH_2PO_4缓冲液1.8 ml，避光置37 ℃、10 min，于冰上终止反应[9]。不含NADPH的样品作为空白对照，在紫外分光光度计上用464 nm和530 nm双波长测定胆红素生成量。HO活性单位用每min每mg蛋白胆红素的生成量表示(nmol·mg^{-1}·min^{-1})，匀浆上清液蛋白测定，用BCA蛋白定量试剂盒测定。

1.2.3 *胎盘组织中CO含量的测定* 采用血红蛋白结合及连二亚硫酸盐还原法检测组织内源性CO含量。取冰冻胎盘组织100 mg加入10%预冷的0.1 mol/L KH_2PO_4缓冲液制成匀浆，4 ℃条件下3000 r/min离心15 min，去除脂层取上清液分装待检。参照乐宏元等[10]的双波长定量测定法，在723型分光光度计上用420 nm和432 nm两个波长测定吸光度，依比尔定律建立综合方程，求出组织匀浆中COHb的含量，间接反应胎盘组织内CO含量。

1.2.4 *胎盘组织可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFIt-1)、血管内皮生长因子(VEGF)的测定* 应用ELSIA法测定胎盘组织中sFIt-1、VEGF，操作严格按照试剂盒说明书进行，具体方法参见文献[11]。标本均为同批测定，组内和组间变异均符合要求。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析，所有数据以均数±标准差表示，各组间均数的比较采用单因素方差分析及SNK-q检验，Pearson相关分析指标间的相关性，相关系数用r表示。检验水准设为α=0.05。

2 结果

2.1 各组孕鼠血压、24 h尿蛋白比较结果

2.1.1 *各组孕鼠血压比较* L.NAME给药前各组孕鼠血压相比无显著差异，给药后第2天HDCP模型组、Hemin组孕鼠血压明显上升。Hemin干预组使用Hemin干预后血压下降，妊娠第20天，HDCP模型组血压为145.33±3.94 mmHg，明显高于正常妊娠组114.83±1.95 mmHg，差异具有统计学意义(P<0.05)。Hemin干预组血压为136.33±2.10 mmHg，明显低于HDCP组，但仍高于正常妊娠组，差异均具有统计学意义(P<0.05，表1)。

2.1.2 *各组孕鼠24 h尿蛋白比较* L.NAME给药前各组孕鼠24 h尿蛋白相比无明显差异，给药后第2天HDCP模型组、Hemin干预组孕鼠尿蛋白开始增加，Hemin干预组孕鼠在使用Hemin干预后尿蛋白减少，妊娠第20天HDCP模型组24 h尿蛋白为(11.55±1.66) mg，较正常妊娠组(6.26±0.60) mg明显增加，两组间差异具有统计学意义(P<0.05)。Hemin干预组24 h尿蛋白为(9.48±0.88) mg，较HDCP组减少，但仍高于正常妊娠组，差异均具有统计学意义(P<0.05，表2)。

表1 各组孕鼠不同妊娠期的收缩压情况

Tab.1 Systolic blood pressure in different groups at different gestational days (GD)(mmHg, *Mean*±*SE*)

Group	GD12	GD16	GD20
HDCP Model	120.62±3.34	145.24±3.65[a]	145.33±3.94[a]
Hemin	119.71±5.62	143.00±2.97[a]	136.33±2.10[ab]
Normal	119.39±7.21	117.28±2.25	114.83±1.95

[a]*P*<0.05 *vs* normal pregnancy rats; [b]*P*<0.05 *vs* HDCP model group.

2.2 各组胎盘组织HO活性及COHb含量

2.2.1 胎盘组织HO活性比较 分光光度法测得HDCP模型组HO活性为(4.75±2.73) $nmol·mg^{-1}·min^{-1}$,明显低于正常妊娠组(11.74±3.92) $nmol·mg^{-1}·min^{-1}$,两组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。Hemin干预组HO活性为(8.69±3.31) $nmol·mg^{-1}·min^{-1}$,较HDCP模型组明显升高,但仍低于正常妊娠组,差异均具有统计学意义(*P*<0.05,表3)。

表2 各组孕鼠24 h尿蛋白比较

Tab.2 24-hour urine protein in different groups (mg, *Mean*±*SE*)

Group	GD12	GD16	GD20
HDCP Model	6.13±0.85	8.19±0.76[a]	11.55±1.66[a]
Hemin	6.01±1.03	8.05±0.85[a]	9.48±0.88[ab]
Normal	6.29±0.68	6.27±0.52	6.26±0.60

[a]*P*<0.05 *vs* normal pregnancy rats; [b]*P*<0.05 *vs* HDCP model group.

表3 各组孕鼠胎盘组织HO活性和CO含量比较

Tab.3 HO activity and CO content in the placenta tissue in different groups (*Mean*±*SE*)

Group	HO activity($nmol·mg^{-1}·min^{-1}$)	COHb (%)
HDCP Model	4.75±2.73[a]	0.17±0.06[a]
Hemin	8.69±3.31[ab]	0.23±0.03[ab]
Normal	11.74±3.92	0.25±0.05

[a]*P*<0.05 *vs* normal pregnancy rats; [b]*P*<0.05 *vs* HDCP model group.

2.2.2 胎盘组织COHb含量比较 双波长法测得HDCP模型组胎盘组织COHb含量为(0.17±0.06)%,明显低于正常妊娠组(0.25±0.05)%,两组差异具有统计学意义(*P*<0.05)。Hemin干预组胎盘中COHb含量(0.23±0.03)%,较HDCP模型组明显增加,但未达正常组水平,差异均具有统计学意义(*P*<0.05,表3)。

2.2.3 胎盘组织HO活性和胎盘组织COHb含量的关系 对各组孕鼠胎盘组织HO活性和胎盘组织CO进行相关性分析,显示两者呈显著正相关关系(*r*=0.53,*P*<0.05)。

2.3 胎盘组织sFlt-1、VEGF含量

2.3.1 胎盘组织中sFlt-1含量比较 ELISA法测得HDCP模型组胎盘组织中sFlt-1含量为(12.02±0.41) pg/ml,较正常妊娠组的(7.03±0.48) pg/ml显著升高(*P*<0.05)。Hemin干预组胎盘组织sFlt-1含量为(9.83±0.30) pg/ml,较HDCP模型组明显降低,但仍高于正常组水平,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。

2.3.2 胎盘组织中VEGF含量比较 ELISA测得HDCP模型组胎盘组织中VEGF含量为(9.43±1.69) pg/ml,低于正常妊娠组的(13.58±0.85) pg/ml,两组间差异有显著性(*P*<0.05)。Hemin干预组胎盘组织中VEGF含量为(11.34±1.04) pg/ml,较HDCP模型组明显升高,但仍低于正常妊娠组,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。

3 讨论

利用动物模型来研究一种疾病的病理机制及探索其有效的防治措施是目前重要的研究方法,动物模型的成功建立是实验顺利进行的关键。为了研究HDCP的发生发展机制,目前国内外已通过不同的方法建立了多种HDCP动物模型[12],如慢性NO合酶抑制模型、子宫胎盘缺血模型、阿霉素肾病模型、链脲霉素模型、内毒素子痫前期模型等[13],其中,较为经典的是Souza[4]及Brown[5]等利用L.NAME建立的HDCP模型。内源性NO是由内皮细胞产生的重要的舒血管物质,L.NAME是一种NO合成酶抑制剂,能竞争性抑制体内NO的合成,使内源性NO合成减少。Brown[5]等利用L.NAME使孕鼠出现高血压、蛋白尿等子痫前期样症状,而对照组并未出现类似症状,利用L.NAME可以建立较为理想的动物模型。本实验采用L.NAME来建立HDCP大鼠模型,实验结果显示,L.NAME灌胃处理后的孕鼠出现血压升高,尿蛋白增加等类似HDCP发病过程的表现,可认为模型的建立是成功的。

HO是血红素分解代谢过程中的关键酶和限速酶,HO及其代谢产物均有强的抗氧化作用[14]。CO是近年发现的一种新的内源性血管舒张因子,可降低血管阻力,增加血流量。有研究资料显示,在HDCP患者体内HO的表达和活性明显下降,CO生成减少[15]。本实验结果显示,HDCP模型组孕鼠胎盘组织中HO活性及COHb含量较正常妊娠组明显降低,血压较正常妊娠组明显升高,24 h尿蛋白明显增加,胎盘CO含量与HO活性呈正相关,与以往的研究结果一致,提示在HDCP的发病过程中,胎盘组织缺血缺氧,可直接抑制HO的活性,而它是产生内源性CO的主要来源,其活性下降可使CO生成减少。胎盘组织HO活性降低、CO生成减少,可能是诱发HDCP发病的机制之一。

VEGF是胎盘分泌的一种促血管生成因子,具有调节血管活性物质释放、促进血管新生的功能。胎盘部位有丰富的VEGF表达,在妊娠过程中参与胎盘血管重铸和滋养细胞入侵,对胎盘局部血流的调节以及血管新生

起到重要作用。sFIt-1是胎盘缺氧释放的特征性因子，也是胎盘产生的内源性抗血管生成蛋白之一，它是VEGF的一种强抑制剂[16]。有研究报道sFIt-1在正常妊娠过程是升高的，但与VEGF的增长保持动态平衡[17]。本研究显示HDCP模型组胎盘组织中sFIt-1水平较正常妊娠组明显升高，但VEGF水平较正常妊娠组降低，打破了正常妊娠过程中sFIt-1/VEGF间的平衡，胎盘组织中异常增加的sFIt-1可与内皮细胞表面受体结合形成异源二聚体，阻碍VEGF的生物活性，从而引起母体血压升高和蛋白尿[18]，推测胎盘分泌的sFIt-1的增加及VEGF水平的下降，可能是HDCP的发病机制之一。因此增加胎盘组织VEGF的水平，降低sFIt-1，恢复sFIt-1/VEGF间的平衡可能成为治疗HDCP的新切入点。

Hemin是一种公认的血红素氧合酶的强诱导剂，已经被证明具有对组织器官毒副作用小，机体对其代谢能力好，耐受性好，且对孕妇和胎儿无毒副作用[19]。在很多动物模型中已证实Hemin可诱导HO的表达和活性，但目前尚无Hemin在HDCP大鼠模型中干预的报道。在本实验中，Hemin的干预使HDCP大鼠血压下降，24 h蛋白尿减少，胎盘组织中HO活性明显升高，CO生成增加，胎盘分泌VEGF增加，sFIt-1的生成减少，推测Hemin在HDCP中发挥治疗作用的可能调控机制是通过诱导血红素氧合酶的表达和活性，增加CO生成，进而下调sFIt-1水平，并增加VEGF的产生，改变sFIt-1/VEGF间的平衡，促进母体血管重铸，保护血管内皮并修复其功能，减少胎盘炎性因子的释放，缓解全身血管痉挛状态，从而降低血压、减少尿蛋白，在HDCP中发挥治疗作用。

综上所述，Hemin能诱导血红素氧合酶的表达和活性，改变胎盘中sFIt-1/VEGF之间的平衡，降低HDCP的血压及尿蛋白水平，可能成为预防或治疗该疾病的潜在药物。

参考文献：

[1] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia[J]. Science, 2005, 308(5728): 1592-4.

[2] Wong RJ, Zhao H, Stevenson DK. A deficiency in haem oxygenase-1 induces foetal growth restriction by placental vasculature defects[J]. Acta Paediatr, 2012, 101(8): 827-34.

[3] Mclaughlin BE, Hutchinson JM, Graham CH, et al. Heme oxygenase activity in term human placenta[J]. Placenta, 2000, 21(8): 870-3.

[4] Souza CO, Peraçoli MT, Weel IC, et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of silibinin on experimental preeclampsia induced by L-NAME in rats[J]. Life Sci, 2012, 91(5/6): 159-65.

[5] Brown C, Mcfarlane-Anderson N, Alexander-Lindo R, et al. The effects of S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine in a rat model of pre-eclampsia[J]. J Nat Sci Biol Med, 2013, 4(2): 330-5.

[6] Botros FT, Dobrowolski L, Navar LG. Renal heme oxygenase-1 induction with hemin augments renal hemodynamics, renal autoregulation, and excretory function[J]. Int J Hypertens, 2012, 2012: 189512.

[7] Yang X, Guo L, Sun X, et al. Protective effects of hydrogen-rich saline in preeclampsia rat model[J]. Placenta, 2011, 32(9): 681-6.

[8] 王 虹, 李华强, 潘 捷. 哮喘患儿血红素氧合酶-1活性的变化及其意义[J]. 中华儿科杂志, 2000, 10(10): 15-7.

[9] 张 薇, 王 玲, 齐宇红. 缺血缺氧新生大鼠脑内HO-1的表达及与CO的相关性[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(17): 1600-3.

[10] 乐宏元, 宋小兴, 刘和平. 一氧化碳血红蛋白双波长定量测量[J]. 临床检验杂志, 1996, 14(2): 87-8.

[11] George EM, Hosick PA, Stec DE, et al. Heme oxygenase inhibition increases blood pressure in pregnant rats[J]. Am J Hypertens, 2013, 26(7): 924-30.

[12] Podjarny E, Baylis C, Losonczy G. Animal models of preeclampsia[J]. Semin Perinatol, 1999, 23 (1): 2-13.

[13] 刘 磊, 刘慧姝, 黄 倩, 等. 水通道蛋白基因4在子痫前期模型大鼠脑组织中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(9): 1329-31.

[14] Mcgeary RP, Szyczew AJ, Toth I. Biological properties and therapeutic potential of bilirubin[J]. Mini Rev Med Chem, 2003, 3(3): 253-6.

[15] Ahmed A, Rahman M, Zhang X, et al. Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation[J]. Mol Med, 2000, 6(5): 391-409.

[16] Bainbridge SA, Smith GN. HO in pregnancy[J]. Free Rad Biol Med, 2005, 38(8): 979-88.

[17] Levine RJ, Sa KC. Circulating angiogenic factors in preeclampsia[J]. Clin Obstet Gynecol, 2005, 48(2): 372-86.

[18] Mateus J, Bytautiene E, Lu F, et al. Endothelial growth factor therapy improves preeclampsia-like manifestations in a murine model induced by overexpression of sVEGFR-1[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(5): H1781-7.

[19] Farfaras A, Zagouri F, Zografos G, et al. Acute intermittent porphyria in pregnancy: a common misdiagnosis[J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2010, 37(4): 256-60.

（编辑：黄开颜）